

Investigating the Effect of Amygdalin Encapsulated in Nano-Chitosan on the Passive Avoidance Memory in Male NMRI Mice

Yaghoub Ahmadi¹
Nasrinsadat Azami^{2,3}
Mahmoud Heidari^{2,3}
Golmohammad Kalteh¹

¹ MSc in Physiology, Department of Biology, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran

² Assistant Professor, Department of Biology, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran

³ Medicinal Plants Research Center, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran

(Received March 17, 2024; Accepted August 24, 2024)

Abstract

Background and purpose: Various studies have been conducted to treat memory and learning disorders using medicinal plants and other compounds. Amygdalin, as the main compound of the seeds of Rosaceae plants, has multiple beneficial properties but can release cyanide compounds in the body. On the other hand, local drug delivery using nanoparticles has created the ability to release the drug with fewer side effects. Chitosan is one of the compounds whose nanoparticles are used in drug delivery systems. In the present study, the impact of non-capsulated and encapsulated amygdalin in chitosan nano-particles on passive avoidance memory has been studied.

Materials and methods: In this experimental research, 150 male NMRI mice aged 5-6 weeks weighing 25-30 gr were used. All injections were done intraperitoneally. This study was conducted in three separate phases. In the first stage, different doses of ethanol were injected (0.25, 0.5, 0.75, and 1 gram per kilogram of body weight) to obtain the appropriate dose for passive avoidance memory impairment. In the second phase, after memory impairment using ethanol, the effect of different doses (6.25, 12.5, 25, and 50 mg/kg) of uncoated amygdalin on passive avoidance memory was evaluated. In the third phase, the effect of the same doses of amygdalin in the previous phase but encapsulated in chitosan nanoparticles was evaluated. The process of investigating passive avoidance memory was carried out on two consecutive days, including the training day and the test day, using the shuttle box device. Data mean and standard deviation was analyzed in GraphPad Prism software via one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test in a $P < 0.05$ significant level.

Results: The results of the first phase showed that ethanol by doses of 0.75 and 1 gram per kilogram body weight at $P < 0.001$ and by dose of 0.5 grams per kilogram body weight at $P < 0.01$ significantly caused amnesia. The results of the second phase showed that all doses of uncoated amygdalin not only did not cause memory impairment but also significantly ($P < 0.0001$) improved ethanol-induced amnesia. In the third phase, the results showed that although all doses of amygdalin encapsulated in chitosan nanoparticles significantly ($P < 0.01$) cause amnesia in doses of 25 and 50 mg/kg, they can improve amnesia in a state-dependent pattern. Comparing the effect of match doses of non-capsulated and encapsulated amygdalin on the passive avoidance memory revealed no significant difference between any of the matched doses so both of them can improve the impaired memory caused by ethanol.

Conclusion: In this study, amygdalin received by the intraperitoneal method was able to improve the impaired avoidance memory and encapsulated in nano chitosan showed a state-dependent learning pattern, probably because cyanide was not released under the influence of the microbial flora of the digestive tract. Therefore, it seems necessary to investigate the effect of oral consumption of amygdalin on avoidance memory, spatial memory, or other cognitive activities.

Keywords: amygdalin, amnesia, chitosan, memory, nano-particle

J Mazandaran Univ Med Sci 2024; 34 (236): 1-13 (Persian).

Corresponding Author: Nasrinsadat Azami and Mahmoud Heidari - Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran. (E-mail: na.azami@iau.ac.ir and Mahmoud.heidari@iau.ac.ir)

بررسی تأثیر آمیگدالین پوشش شده با نانوذرات کیتوزان بر حافظه اجتنابی غیر فعال موش سوری نر نژاد NMRI

یعقوب احمدی^۱
نسرین سادات اعظمی^{۲،۳}
محمود حیدری^{۳،۴}
گل محمد کلتی^۱

چکیده

سابقه و هدف: مطالعات مختلفی جهت درمان اختلالات حافظه و یادگیری با استفاده از گیاهان دارویی و ترکیبات مختلف صورت گرفته است. آمیگدالین به عنوان ترکیب اصلی دانه گیاهان تیره گل سرخیان، هر چند دارای ویژگی های سودمند متنوعی است ولی می تواند در بدن ترکیب سیانیدی آزاد کند. از طرف دیگر، دارو رسانی در محل با کمک نانوذرات می تواند عوارض کمتری به همراه داشته باشد. کیتوزان یکی از ترکیباتی است که از نانوذرات آن در سیستم دارورسانی استفاده می شود. لذا در مطالعه حاضر تأثیر آمیگدالین پوشش نشده و پوشش شده با نانوذرات کیتوزان بر حافظه اجتنابی غیرفعال مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی ۱۵۰ سر موش سوری نر نژاد NMRI با سن ۵-۶ هفته ای و وزن ۳۰-۲۵ گرم مورد استفاده قرار گرفت. تمامی تزریقات به صورت درون صفاقی صورت گرفت. این مطالعه در سه مرحله جداگانه انجام گرفت. در مرحله اول تزریق دوزهای مختلف اتانول (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ گرم در هر کیلوگرم وزن بدن) به منظور به دست آوردن دوز مناسب برای تخریب حافظه اجتنابی غیر فعال انجام گرفت. در مرحله دوم پس از تخریب حافظه با استفاده از اتانول، تأثیر دوزهای مختلف (۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ mg/kg) آمیگدالین پوشش نشده بر حافظه اجتنابی غیر فعال مورد ارزیابی قرار گرفت و در مرحله سوم تأثیر دوزهای مختلف آمیگدالین مرحله قبل ولی پوشش شده با نانوذرات کیتوزان مورد ارزیابی قرار گرفت. فرایند بررسی حافظه اجتنابی غیرفعال طی دو روز پشت سر هم شامل روز آموزش و روز آزمون با استفاده از دستگاه شاتل باکس انجام گرفت. میانگین و انحراف معیار داده های حافظه اجتنابی در نرم افزار گراف پد پریسم وارد و توسط آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و تست توکی در سطح معنی داری $P < 0/05$ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها: نتایج آزمایش مرحله اول نشان داد که اتانول با دوزهای ۰/۷۵ و ۱ گرم در هر کیلوگرم وزن بدن در $P < 0/001$ و با دوز ۰/۵ گرم در هر کیلوگرم وزن بدن در $P < 0/01$ به طور معنی داری باعث ایجاد فراموشی می شود. نتایج آزمایش مرحله دوم نشان داد که تمامی دوزهای آمیگدالین پوشش نشده نه تنها باعث تخریب حافظه نمی شوند؛ بلکه با اختلاف معنی داری ($P < 0/0001$) باعث بهبود فراموشی ناشی از اتانول می شوند. در مرحله سوم نتایج نشان داد که آمیگدالین پوشش شده با نانو ذرات کیتوزان هر چند در همه دوزها با اختلاف معنی داری ($P < 0/01$) باعث ایجاد فراموشی می شوند ولی در دوزهای ۲۵ و ۵۰ mg/kg نتوانستند در یک الگوی وابسته به وضعیت باعث بهبود فراموشی ناشی از اتانول شوند. هم چنین مقایسه تأثیر دو به دو دوزهای آمیگدالین پوشش نشده و پوشش شده با نانوذرات کیتوزان بر حافظه اجتنابی نشان داد که تفاوت معنی داری بین هیچ کدام از دوزها وجود ندارد و هر دو می توانند باعث بهبود حافظه تخریب شده ناشی از اتانول شوند.

استنتاج: آمیگدالین دریافت شده به روش درون صفاقی در این مطالعه توانست حافظه اجتنابی تخریب شده را بهبود ببخشد و به صورت پوشش شده در نانو کیتوزان الگوی یادگیری وابسته به وضعیت را به نمایش بگذارد؛ احتمالاً به این دلیل که تحت تأثیر فلور میکروبی دستگاه گوارش سیانید آزاد نشده است. بنابراین بنظر می رسد بررسی تأثیر مصرف خوراکی آمیگدالین بر حافظه اجتنابی، حافظه فضایی یا دیگر فعالیت های شناختی ضروری باشد.

واژه های کلیدی: آمیگدالین، حافظه، فراموشی، کیتوزان، نانوذرات

مؤلف مسئول: نسرین سادات اعظمی و محمود حیدری - گرگان: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان E-mail: Na.azami@iau.ac.ir, Mahmoud.heidari@iau.ac.ir

۱. کارشناسی ارشد فیزیولوژی، گروه زیست شناسی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران

۲. استادیار، گروه زیست شناسی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران

۳. مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۲۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۳/۱/۲۵ تاریخ تصویب: ۱۴۰۳/۶/۳

مقدمه

حافظه یکی از مهم ترین و تکامل یافته ترین فرایندهای شناختی است که از طریق آن اطلاعات به دست آمده و دریافت شده از محیط رمز گذاری، ذخیره و ثبت می شوند و در مواقع لزوم یادآوری می شوند (۱). بیماری آلزایمر، وضعیتی برگشتناپذیر و پیشرونده است که در آن سلول های عصبی در مغز تحلیل می روند و اندازه مغز کاهش پیدا می کند، که موجب اختلالاتی در سیستم شناختی از جمله حافظه و توانایی های فکری و تغییرات رفتاری می شود (۲،۳). این بیماری قسمتی از مغز به نام هیپوکامپ را هدف قرار می دهد که با حافظه مرتبط است (۴).

بیماری آلزایمر زمانی رخ می دهد که مقادیر غیر طبیعی پروتئین آمیلوئید بتا به صورت خارج سلولی در قالب پلاک آمیلوئیدی و هم چنین مقادیر غیر طبیعی پروتئین تاو به صورت داخل سلولی در قالب توده های نوروفیبریلار در مغز ایجاد شود که بر عملکرد عصبی و ارتباطات مغز تأثیر می گذارد و منجر به نابودی تدریجی عملکرد مغز می شود (۵). اولین مرحله بیماری آلزایمر معمولاً فراموشی است که با کمی اضطراب و افسردگی خفیف همراه است؛ که این معمولاً به از دست دادن جدی تر حافظه، به ویژه رویدادهای اخیر مکانی و زمانی، بی نظمی، از دست دادن توانایی تمرکز و به دنبال آن هذیان، توهم، زوال جسمانی و سرانجام مرگ می شود که این علائم در شب شدیدتر است (۲). فراموشی یک اصطلاح کلی برای توصیف از دست دادن جزئی یا کلی حافظه است (۲) علل متعددی برای فراموشی وجود دارد، که می توان به سکنه مغزی، ضربه مغزی و آسیب به مغز، جراحی، اعتیاد به الکل، استرس، درمان تشنج الکتریکی، برخی از داروها و شرایطی مانند بیماری آلزایمر اشاره کرد (۲). الکل در موارد مختلفی استفاده می شود؛ استفاده بی رویه و روزانه از الکل به عنوان نوشیدنی در جوامع مختلف می تواند به تدریج اثرات سوء و زیان آوری را به فرد و جامعه حاصل آورد و اثرات مخربی بر روی

اعضای مختلف بدن و اندام هایی چون مری، معده، کبد، قلب، سیستم عصبی و... بر جای بگذارد (۸-۶). یکی از مهم ترین بخش های سیستم عصبی مرکزی که اتانول بر روی آن اثر می گذارد، هیپوکامپ است که این بخش نقش حیاتی در روند شناخت و درک فضا دارد که می توان گفت که قرار گرفتن در معرض الکل موجب نقصان در یادگیری (به خصوص یادگیری اجتنابی غیرفعال) و حافظه فضایی می شود (۱۱-۹). یادگیری اجتنابی یکی از انواع مختلف یادگیری است و خود شامل دو نوع فعال و غیرفعال است. در نوع یادگیری اجتنابی غیر فعال که در مطالعه حاضر نیز انجام شد حیوان یاد می گیرد که از ورود به جایی که در آن مورد آزار و تنبیه قرار گرفته است دوری کند (۱۲). یکی از آزمون های رفتاری برای سنجش و ارزیابی این نوع حافظه، آزمون اجتنابی غیرفعال مدل Step-Through با استفاده از دستگاه شاتل باکس است که در این آزمون هر چه میزان تأخیر ورود به خانه تاریک (محل دریافت شوک) بیش تر باشد، یادگیری و حافظه حیوان بیش تر است (۱۲). شواهد موجود نشان می دهند که اتانول اثرات خود روی سیستم عصبی را با تأثیر مستقیم یا غیر مستقیمی که بر روی سیستم های نوروترانسمیتری مختلف به ویژه استیل کولین، دوپامین، گابا، گلو تامات و نوروترانسمیترهای آمینواسیدی می گذارد، به کار می برد (۱۲). با وجود تأثیر گذاری اتانول روی سیستم های نوروترانسمیتری مختلف به نظر می رسد که تأثیر اتانول بر سیستم کولینرژیک، به ویژه در ناحیه هیپوکامپ، نقش کلیدی تری روی حافظه دارد (۱۳). درواقع اتانول می تواند سیستم کولینرژیک را تضعیف نماید و رهایش استیل کولین را در هیپوکامپ و قشر مخ کاهش دهد (۱۴،۱۵).

مطالعات مختلفی جهت درمان اختلالات حافظه و یادگیری با استفاده از گیاهان دارویی و ترکیبات مختلف در حیوانات مدل آلزایمری صورت گرفته است (۱۶،۱۷). هسته گیاهان تیره گل سرخیان مانند زردآلو، بادام تلخ، ازگیل، سیب، هلو و آلو منبع اصلی

آمیگدالین می‌باشد. آمیگدالین از نظر ساختمان شیمیایی از دو مولکول گلوکز، یک بنزالدهید با خاصیت ضد درد و یک هیدروسیانیک اسید با خاصیت ضد سرطانی تشکیل شده است (۲۰-۱۸). لذا یکی از اهداف این مطالعه، بررسی تأثیر آمیگدالین به تنهایی بر فراموشی ناشی از اتانول در حافظه اجتنابی بوده است. از طرف دیگر برای رسیدن داروها به سیستم عصبی مرکزی محدودیت‌های متعددی از جمله حلالیت ناچیز، فراهمی زیستی کم (Bioavailability) و کاهش کارایی به دلیل عبور از سد خونی مغزی وجود دارد (۱۷). با این حال، سیستم‌های دارو رسانی بر پایه نانو ذرات، پتانسیل قابل توجهی برای عبور از این مانع دارند و نه تنها منجر به افزایش کارایی درمان می‌شوند بلکه از عوارض جانبی ناخواسته ناشی از توزیع نامشخص دارو نیز می‌کاهند (۲۱). نانوذرات کیتوزان به‌عنوان یک سیستم دارو رسانی هدفمند و پر کاربرد برای درمان اختلالات تحلیل برنده سیستم عصبی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (۱۷، ۲۲). کیتوزان، یک هتروپلیمر با پایه طبیعی است که از استیل‌زدایی قلیایی کیتین به‌دست می‌آید و نانوذرات آن به دلیل پایداری بهتر، غیر سمی بودن، زیست سازگاری و زیست تخریب پذیر بودن، ابزار ارزشمندی برای سیستم‌های دارورسانی ارائه می‌کنند (۲۲). بنابراین هدف کلی این مطالعه، بررسی انتقال آمیگدالین پوشش نشده و پوشش شده با نانوذرات کیتوزان در مدل بیماری فراموشی بوده است.

حیوانات آزمایشگاهی

در این مطالعه تجربی که با کد اخلاق IR.IAU.AK.REC.1397.004 مورد تصویب قرار گرفته است؛ از موش‌های سوری نر نژاد NMRI به وزن تقریبی ۲۵-۳۰ گرم خریداری شده از شرکت پیشرو مهرآوران آزما پارس واقع در مازندران و با رعایت اصول موازین اخلاقی کار با حیوانات استفاده شد. پس از انتقال موش‌ها به حیوان خانه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی گرگان، در هر قفس ۶ سر موش به‌طور تصادفی قرار داده شد. حیوانات در چرخه شبانه روزی استاندارد

(۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی) که در این مطالعه ۸ صبح تا ۸ شب و در دمای 22 ± 3 درجه سانتی‌گراد و دسترسی آزاد به آب و غذای کافی نگهداری شدند و هر سه روز یک بار قفس موش‌ها تمیز می‌شد. به موش‌ها اجازه داده شد تا به مدت دو هفته خود را با شرایط حیوان خانه تطبیق دهند. همه آزمایش‌ها در یک ساعت مشخصی از طول روز انجام گرفت (۱۷).

ترکیبات مورد استفاده

آمیگدالین با خلوص ۹۸/۲ درصد فرآوری شده توسط مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه آزاد اسلامی گرگان تهیه گردید. کیتوزان از استیل‌زدایی کیتین به‌دست آمده از پوست میگوی خلیج فارس (بوشهر) و به روش الکتروشیمیایی نوین تهیه و نانو بودن ذرات آن توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره تایید شد (۲۲).

سیستم حافظه اجتنابی غیر فعال

از دستگاه شاتل باکس ساخت شرکت برج صنعت برای ارزیابی رفتار اجتنابی غیر فعال استفاده گردید (۲۳). دستگاه دارای یک محفظه تاریک و یک محفظه روشن است. محفظه روشن دارای دیواره‌های سفید و فاقد درپوش است درحالی‌که محفظه تاریک دارای دیواره‌های سیاه رنگ با درپوش کشویی سیاه رنگ است و در کف آن میله‌های فلزی شوک دهنده‌ای وجود دارد که به دستگاه استیمولاتور وصل شده‌اند و می‌توانند جریان الکتریکی با شدت یک میلی‌آمپر و فرکانس ۵۰ هرتز را به مدت ۳ ثانیه به حیوان منتقل نماید. بین دو محفظه یک درب گیوتنی سیاه رنگ وجود دارد (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: دستگاه شاتل باکس

گروه‌های آزمایشی

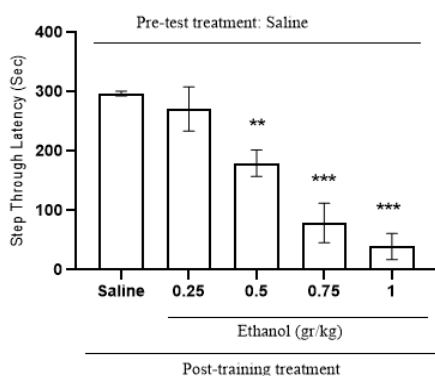
این مطالعه طی سه مرحله مجزا صورت گرفت. مجموعاً از ۲۵ گروه (هر گروه شامل ۶ سر موش) استفاده شد. همه تزریقات به صورت درون صفاقی و در روز آموزش بلافاصله بعد از آموزش و در روز آزمون ۳۰ دقیقه قبل از آزمون صورت گرفت. آزمایش اول، ۵ گروه جهت به دست آوردن دوز موثر اتانول جهت القاء فراموشی استفاده شد. موش‌های گروه اول بلافاصله بعد از آموزش سالین و قبل از آزمون (روز بعد) نیز سالین دریافت کردند. موش‌های گروه‌های دوم، سوم، چهارم و پنجم، بلافاصله بعد از آموزش، دوزهای ۱ gr/kg، ۰/۷۵، ۰/۵، ۰/۲۵ اتانول دریافت کردند و در روز آزمون سالین دریافت کردند.

آزمایش دوم، ۴ گروه جهت به دست آوردن Dose response آمیگدالین استفاده شد تا بررسی شود که آیا آمیگدالین به تنهایی در حافظه تأثیر دارد. همه گروه‌ها بعد از آموزش، سالین و روز آزمون دوزهای مختلف آمیگدالین ۶/۲۵ mg/kg، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ دریافت کردند و با گروه سالین - سالین آزمایش اول مقایسه شدند.

آزمایش سوم، ۵ گروه جهت بررسی تأثیر آمیگدالین پس از القاء فراموشی ناشی از اتانول استفاده شد. گروه اول در روز آموزش اتانول (۱ gr/kg) و در روز آزمون سالین دریافت کردند. گروه‌های دوم تا پنجم در روز آموزش اتانول (۱ gr/kg) و در روز آزمون دوزهای مختلف آمیگدالین ۶/۲۵ mg/kg، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ دریافت کردند و با گروه سالین - سالین آزمایش اول مقایسه شدند. آزمایش چهارم، ۵ گروه جهت به دست آوردن Dose response آمیگدالین پوشش شده با نانوذرات کیتوزان انجام شد. گروه اول بلافاصله بعد از آموزش سالین و در روز آزمون نانوکیتوزان دریافت کردند. گروه‌های دوم تا پنجم در روز آموزش، سالین و در روز آزمون دوزهای مختلف آمیگدالین پوشش شده با نانوذرات کیتوزان (۶/۲۵ mg/kg، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰) را دریافت کردند و با گروه سالین - سالین آزمایش اول مقایسه شدند.

بررسی رفتار اجتنابی غیرفعال در دو روز متوالی انجام می‌شود (۲۲). روز اول، روز آموزش است که دارای دو جلسه است و روز دوم، روز آزمون است که برای بررسی حافظه مورد استفاده قرار می‌گیرد. در فرایند آموزش، هر موش به آرامی در محفظه روشن قرار داده می‌شود و بعد از ۵ تا ۱۰ ثانیه درب گیوتنی باز می‌شود و به حیوان اجازه داده می‌شود که وارد محفظه تاریک شود. مدت زمان تأخیر ورود به محفظه تاریک (StepThrough Latency: STL) یادداشت می‌شود. مدت زمان تأخیر کم‌تر از ۱۰۰ ثانیه باشد، نشانه سلامت رفتاری حیوان است. زمان تأخیر اولیه بیش از ۱۰۰ ثانیه باعث حذف حیوان از مطالعه می‌گردد. زیرا موش سالم ذاتاً فضای تاریک را به فضای روشن ترجیح می‌دهد. پس از ورود حیوان به محفظه تاریک، درب گیوتینی بسته شد و پس از ۱۰ ثانیه حیوان به قفس خود بر می‌گردد (مرحله سازگاری). ۳۰ دقیقه بعد، موش مجدداً در محفظه روشن قرار می‌گیرد و بعد از ۵ تا ۱۰ ثانیه درب گیوتنی باز می‌شود و به محض ورود حیوان به محفظه تاریک، درب گیوتنی بسته شده و به حیوان شوک داده می‌شود و بعد از ۱۵ تا ۲۰ ثانیه به قفس برگردانده می‌شود (مرحله یادگیری). ۲ دقیقه بعد بار دیگر حیوان در محفظه روشن قرار داده می‌شود و درب گیوتنی باز شده و دو دقیقه به حیوان فرصت داده می‌شود؛ اگر حیوان وارد محفظه تاریک شد، مجدداً شوک و تست آموزش تکرار می‌شود اما اگر وارد محفظه تاریک نشد، آموزش ایجاد شده است و موش به قفس برگردانده می‌شود. ۲۴ ساعت بعد از آموزش، آزمون بازیابی انجام می‌شود تا حافظه بلند مدت حیوان بررسی شود. ابتدا حیوان در محفظه روشن قرار می‌گیرد و بعد از ۲۰ ثانیه درب گیوتنی باز می‌شود و مدت زمان تأخیر ورود یادداشت می‌شود. حداکثر زمانی که اجازه داده می‌شود ۵ دقیقه می‌باشد. اگر تثبیت حافظه اتفاق افتاده باشد، حیوان وارد محفظه تاریک نمی‌شود.

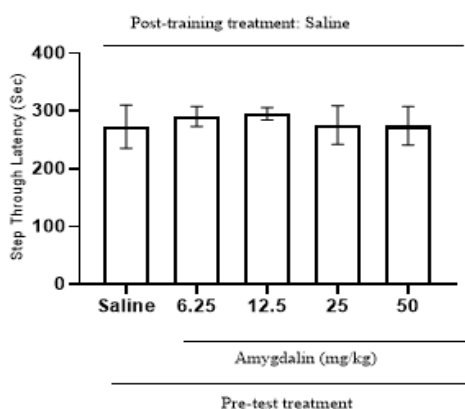
حیواناتی که پس از آموزش و قبل از آزمون سالین دریافت کرده بودند، هیچ تأثیر معنی داری بر حافظه اجتنابی نداشت.



نمودار شماره ۱: تأثیر اتانول بر حافظه اجتنابی، دوزهای ۱ gr/kg، ۰/۷۵ و ۰/۵ با اختلاف معنی داری در مقایسه با گروه سالین / سالین باعث تخریب حافظه شدند.

داده‌ها به صورت Mean $\pm$ SD گزارش شده‌اند.

***: $P < 0.001$ و **: $P < 0.01$



نمودار شماره ۲: تأثیر دوزهای مختلف آمیگدالین پوشش نشده بر حافظه اجتنابی، تمامی دوزهای آمیگدالین پوشش نشده تأثیر معنی داری بر حافظه در مقایسه با گروه سالین / سالین نشان ندادند.

داده‌ها به صورت Mean $\pm$ SD گزارش شده‌اند.

$P < 0.05$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

آنالیز داده‌ها در آزمایش سوم (نمودار شماره ۳) نشان داد که پس از تزریق ۱ gr/kg اتانول بعد از آموزش و تخریب حافظه، همه دوزهای آمیگدالین ۶/۲۵ mg/kg، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ توانستند فراموشی ایجاد

آزمایش پنجم، ۶ گروه جهت بررسی تأثیر آمیگدالین پوشش شده با نانوذرات کیتوزان پس از القاء فراموشی ناشی از اتانول استفاده شد. گروه اول در روز آموزش، اتانول ۱ gr/kg و در روز آزمون، سالین دریافت کردند. گروه دوم در روز آموزش، اتانول ۱ gr/kg و در روز آزمون، نانوذرات کیتوزان دریافت کردند. گروه‌های سوم تا ششم در روز آموزش، اتانول ۱ gr/kg و در روز آزمون دوزهای مختلف آمیگدالین پوشش شده با نانوذرات کیتوزان ۶/۲۵ mg/kg، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ دریافت کردند.

تجزیه و تحلیل آماری

در تمام آزمایش‌ها، میزان تأخیر در ورود به خانه تاریک در روز آزمون شاخص حافظه بوده و به عنوان داده ثبت شدند. نرمال بودن داده‌ها پس از ورود به نرم افزار گراف پد پرسم ورژن ۸ به روش کولموگروف اسمیرنوف بررسی و سپس به صورت میانگین و انحراف از معیار با روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و تست تعقیبی توکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقدار $P < 0.05$ سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

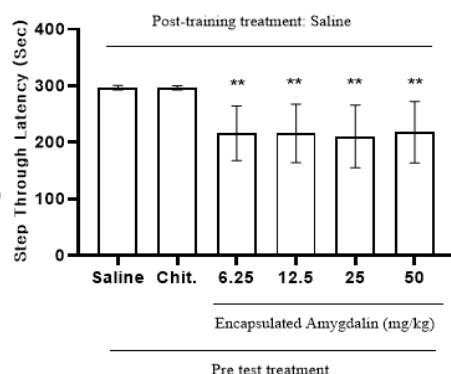
یافته‌ها

همان طور که نمودار شماره ۱، نشان می‌دهد در آزمایش اول تزریق دوزهای (۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ گرم در هر کیلوگرم وزن بدن) اتانول پس از آموزش و سالین قبل از آزمون در مقایسه با حیواناتی که پس از آموزش سالین و قبل از آزمون سالین دریافت نمودند به طور معنی داری سبب تخریب حافظه و ایجاد فراموشی شدند. در واقع تخریب در دوزهای ۰/۷۵ و ۱ گرم در هر کیلوگرم وزن بدن در $P < 0.001$ و در دوز ۰/۵ گرم به صورت $P < 0.01$ معنی دار شده است.

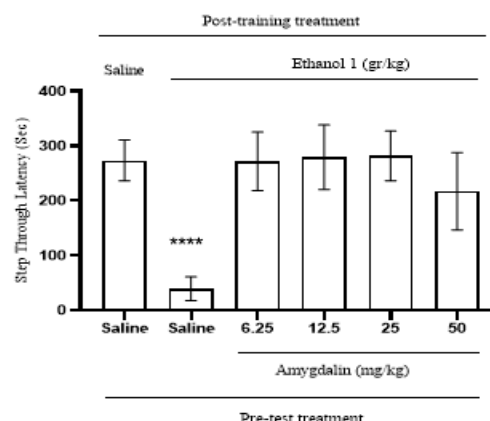
آنالیز داده‌ها در آزمایش دوم (نمودار شماره ۲) نشان داد که تزریق دوزهای مختلف آمیگدالین ۶/۲۵ mg/kg، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ قبل از آزمون، نسبت به

شده توسط اتانول را بهبود ببخشند و تفاوت معنی داری نسبت به گروه سالین / سالین نداشتند. در حالی که گروه اتانول/سالین نسبت به گروه سالین - سالین اختلاف معنی داری ($P < 0.0001$) را نشان دادند.

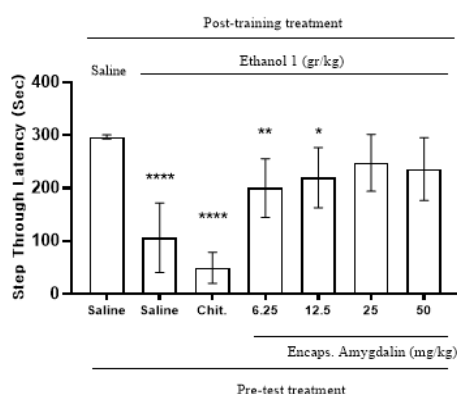
ترتیب با اختلاف معنی داری در $P < 0.01$ و $P < 0.05$ کم تر از گروه سالین / سالین بود. هم چنین حافظه اجتنابی در گروه های نانوذرات کیتوزان و گروه اتانول / سالین با اختلاف معنی داری ($P < 0.0001$) کم تر از گروه سالین / سالین به دست آمد.



نمودار شماره ۴: تأثیر دوزهای مختلف آمیگدالین پوشش شده با نانوذرات کیتوزان و نانوذرات کیتوزان به تنهایی بر حافظه اجتنابی، همه دوزهای آمیگدالین پوشش شده با نانوذرات کیتوزان با اختلاف معنی داری باعث ایجاد فراموشی در مقایسه با گروه سالین / سالین شدند. در حالی که گروه نانوکیتوزان تأثیری بر حافظه نداشت. داده ها به صورت $Mean \pm SD$ گزارش شده اند؛ $P < 0.01$: **



نمودار شماره ۳: تأثیر دوزهای مختلف آمیگدالین بر فراموشی ناشی از اتانول، همه دوزهای آمیگدالین باعث بهبود حافظه شدند و اختلاف معنی داری با گروه سالین / سالین نداشتند، در حالی که گروه اتانول / سالین دارای کاهش معنی داری در حافظه اجتنابی در مقایسه با گروه سالین / سالین بود. داده ها به صورت $Mean \pm SD$ گزارش شده اند؛ $P < 0.0001$: ****



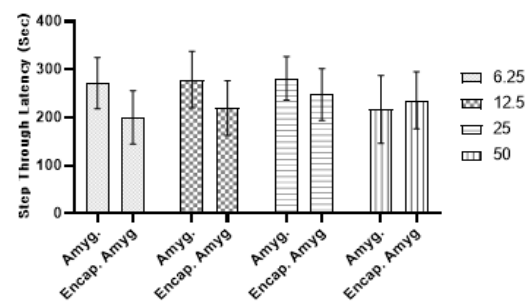
نمودار شماره ۵: تأثیر دوزهای مختلف آمیگدالین پوشش شده با نانوذرات کیتوزان بر فراموشی ناشی از اتانول، دوزهای ۲۵ mg/kg و ۵۰ mg/kg آمیگدالین پوشش شده با نانوذرات کیتوزان باعث بهبود فراموشی ناشی از اتانول شدند. حافظه اجتنابی در دوزهای ۶/۲۵ mg/kg و ۱۲/۵ mg/kg آمیگدالین پوشش شده با نانوذرات کیتوزان، گروه نانوذرات کیتوزان و گروه اتانول / سالین با اختلاف معنی داری کم تر از گروه سالین / سالین بود.

****: $P < 0.0001$ و **: $P < 0.01$ و *: $P < 0.05$

آنالیز داده ها در آزمایش چهارم (نمودار شماره ۴) نشان داد که تزریق دوزهای مختلف آمیگدالین پوشش شده با نانوذرات کیتوزان ۶/۲۵ mg/kg، ۱۲/۵ mg/kg و ۲۵ و ۵۰ قبل از آزمون با اختلاف معنی داری ($P < 0.01$) باعث تخریب حافظه و ایجاد فراموشی نسبت به گروه سالین / سالین شد، اما تزریق قبل از آزمون کیتوزان تأثیری بر حافظه اجتنابی نداشت.

آنالیز داده ها در آزمایش پنجم (نمودار شماره ۵) نشان داد که پس از تزریق ۱ gr/kg اتانول در روز آموزش و ایجاد فراموشی، دوزهای ۲۵ و ۵۰ mg/kg آمیگدالین پوشش شده با نانوذرات کیتوزان اختلاف معنی داری در مقایسه با گروه سالین / سالین نشان ندادند به عبارت دیگر باعث بهبود فراموشی ناشی از اتانول شدند. ولی حافظه اجتنابی در دوزهای ۶/۲۵ mg/kg و ۱۲/۵ mg/kg آمیگدالین پوشش شده با نانوذرات کیتوزان به

آنالیز داده‌ها جهت مقایسه دو به دو دوزهای مختلف آمیگدالین پوشش نشده و پوشش شده با نانوذرات کیتوزان (نمودار شماره ۶) نشان داد که تفاوت معنی داری بین دوزهای مشابه بر حافظه اجتنابی وجود ندارد.



نمودار شماره ۶: مقایسه دوزهای مختلف آمیگدالین پوشش نشده و پوشش شده با نانوذرات کیتوزان در حافظه اجتنابی، تفاوت معنی داری بین هیچ کدام از دوزها مشاهده نشد.

بحث

در مطالعه حاضر، تأثیر آمیگدالین به دو صورت پوشیده شده با نانوذرات کیتوزان و بدون پوشش بر حافظه اجتنابی تخریب شده با اتانول مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه که از اتانل جهت القاء فراموشی استفاده گردید که نشان داده شد، دوز ۰/۵ gr/kg و بالاتر توانایی القاء فراموشی را دارند (نمودار شماره ۱). به طور کلی، جهت تخریب حافظه و ایجاد فراموشی از اتانول و یا اسکوپولامین استفاده می‌شود. این دو ماده باعث تخریب حافظه اجتنابی غیرفعال (مهارى) می‌شوند هر چند که قادر به ایجاد یادگیری وابسته به وضعیت (state-dependent learning) نیز می‌باشند (۲۴-۲۶). اتانول و داروهای دیگر جهت ایجاد فراموشی به روش‌های مختلفی مورد استفاده واقع شده‌اند به نحوی که در برخی از مطالعات، قبل از فرایند آموزش، در برخی موارد همانند مطالعه حاضر (نمودار شماره ۱) بعد از فرایند آموزش و در برخی دیگر قبل از فرایند آزمون استفاده شده‌اند (۲۷-۲۹، ۲۲). مطالعات نشان داده‌اند که مصرف زیاد اتانول، می‌تواند فعالیت آنزیم استیل کولین

استراز را در هیپوکامپ حیوانات افزایش دهد (۳۰، ۳۱). استفاده از مهارکننده‌های استیل کولین استراز منجر به افزایش عملکرد سیستم کولینرژیک مغز می‌شود و از این روش برای درمان بیماری‌های حافظه (حافظه اجتنابی غیرفعال) استفاده می‌شود (۳۲، ۳۳). در واقع می‌توان گفت که نخستین خط درمانی در بیماری‌های شناختی مانند آلزایمر، استفاده از داروها و ترکیبات تقویت کننده تولید استیل کولین و مهارکننده آنزیم استیل کولین استراز برای حفظ سطح استیل کولین هیپوکامپ است (۳۴).

نتایج این مطالعه (نمودار شماره ۲) نشان داد که دوزهای آمیگدالین پوشش نشده مورد استفاده باعث تخریب حافظه اجتنابی نمی‌شوند. این نتایج همسو با مطالعه Iwasa و همکاران (۲۰۲۳) بود که در ارتباط با تأثیر آمیگدالین بر حافظه گزارش کرده‌اند که هر چند استفاده از پودر برگ گیاه از گیل ژاپنی به عنوان منبع آمیگدالین و اورسولیک اسید به مدت سه ماه باعث افزایش مختصری در میزان تولید پروتئین آمیلوئید بتا در کورتکس مخ موش‌های آزمایشگاهی می‌گردد ولی تأثیر معنی داری بر حافظه (working memory) و فعالیت حرکتی (locomotion activity) نداشته است. به علاوه این که این تأثیر پس از مصرف طولانی مدت (۱۲ ماه) در جهت بهبود فعالیت حرکتی و حافظه نیز بوده است و پیشنهاد کرده‌اند که این ترکیبات اثرات مفید خود را احتمالاً از طریق افزایش سیگنالینگ CREB-BDNF اعمال می‌کنند که ژن‌های دخیل در تقویت سیناپس‌های نورونی واقع در هیپوکامپ می‌باشند (۳۵، ۳۶).

بخش دیگری از نتایج این مطالعه (نمودار شماره ۳) نشان داد که آمیگدالین نه تنها تأثیر مخربی بر حافظه ندارد بلکه حافظه‌ای که به وسیله اتانول تخریب شده است نیز توسط تمامی دوزهای آمیگدالین (بهترین عملکرد مربوط به دوز ۲ mg/kg) بهبود یافتند و تفاوت معنی داری در شاخص ارزیابی حافظه با گروه سالیین نداشتند. در توجیه تأثیر سودمند آمیگدالین بر بهبود عملکرد سیستم عصبی، Cheng و همکاران (۲۰۱۵) در یک مطالعه پروتئومیک

به بررسی تاثیر محافظتی آمیگدالین در سیستم عصبی و خاصیت عصب‌زایی (neuritogenic) آن پرداخته و نشان دادند که آمیگدالین باعث افزایش تولید فاکتور رشد عصبی (NGF) در رده سلولی دوپامینرژیک می‌گردد و این تاثیرات سودمند را از طریق یک پروتئین چاپرون متصل شونده به کلسیم بنام کالرتیکولین اعمال می‌کند (۳۷). هرچند برای آمیگدالین تاثیرات سودمند زیادی از جمله اثرات ضد توموری، ضد سرطانی، ضد التهابی و ... بر شمرده شده است؛ ولی آمیگدالین پس از ورود به بدن به بنز آلدئید، گلوکز و سیانید هیدرولیز می‌شود، بنز آلدئید و سیانید آزاد شده اثرات سمی روی حیوانات دارند و هیدروژن سیانید (HCN) می‌تواند مانع استفاده سلول‌ها از اکسیژن گردد و منجر به ایجاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن شود و سلول‌ها به‌ویژه سلول‌های عصبی را از بین ببرد (۳۸، ۳۹، ۱۹). در این خصوص رجایی و همکاران در سال ۲۰۱۳ جهت بررسی تاثیر آمیگدالین بر ساختار مغز، نشان دادند که آمیگدالین باعث کاهش تعداد سلول‌های پورکنژ در قشر مخچه موش سوری می‌شود (۴۰). البته باید به این نکته اشاره داشت که در مطالعه حاضر، آمیگدالین به‌صورت درون صفاقی وارد بدن شده است. در این صورت متابولیسم آن تحت تاثیر باکتری‌های فلور طبیعی روده قرار نگرفته و لذا ترکیب سیانیدی آن تولید نشده است (۴۰). به‌علاوه این که آنزیم بتاگلوکوزیداز که یکی از آنزیم‌هایی دخیل در آزادسازی سیانید از آمیگدالین است در سلول‌های روده باریک وجود دارند (۴۱). نکته مهم دیگر، دوز آمیگدالین و مدل حیوانی مورد استفاده در مطالعات است که ممکن است تاثیرات متفاوت آمیگدالین را توجیه نماید. در این خصوص نشان داده شده است که نیمه عمر سیانید حداقل در جوندگان مختلف متفاوت است (۴۲). با توجه به تاثیرات مثبت آمیگدالین در این مطالعه، در صورتی که آمیگدالین خوراکی نیز بتواند در فراموشی و بازیابی حافظه موثر باشد می‌تواند به عنوان یک راهکار دارویی در درمان بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی مدنظر

قرار گیرد. در ارتباط با آمیگدالین پوشش شده با نانوذرات کیتوزان، نتیجه جالب توجهی به‌دست آمد به این صورت که همه دوزهای آمیگدالین پوشش شده با نانوذرات کیتوزان با اختلاف معنی‌داری باعث ایجاد فراموشی شدند (نمودار شماره ۴). از آنجایی که کیتوزان به تنهایی نه در تخریب و نه در بهبود حافظه نقشی نداشته است، احتمالاً ویژگی سیانیدی آمیگدالین در کنار کیتوزان را بتوان یکی از عوامل تخریب حافظه دانست. این در حالی است که دوزهای بالای آمیگدالین پوشش شده با نانوکیتوزان (۵۰ و ۲۵ mg/kg) توانستند فراموشی ناشی از اتانول را بهبود بخشند (نمودار شماره ۵). به عبارت دیگر عاملی که خود باعث تخریب حافظه شده بود توانست حافظه تخریب شده ناشی از اتانول را بهبود بخشد. در توجیه این امر می‌توان به یادگیری وابسته به وضعیت اشاره کرد. در این نوع یادگیری، بازیابی حافظه از دست رفته تنها در شرایطی اتفاق می‌افتد که فرد در هر دو مرحله رمزگذاری و بازیابی در یک وضعیت فیزیولوژیک یکسان باشد؛ به عبارت دیگر عاملی که باعث تخریب حافظه شده است می‌تواند باعث بهبود حافظه از دست رفته نیز باشد (۴۳). هر چند که بهتر است آزمایشات دیگری برای اثبات این نتیجه انجام گیرد.

در نمودار شماره ۴ و نمودار شماره ۵، نشان داده شد که نانوذرات کیتوزان نه در تخریب حافظه اجتنابی و نه در بهبود آن تاثیری نداشتند، لذا پتانسیل استفاده از این نانوذرات به‌عنوان یک حامل مفید جهت دارورسانی به سیستم عصبی وجود دارد. با این حال مقایسه دوزهای هم مقدار (matched) آمیگدالین پوشش شده و پوشش نشده با نانوذرات کیتوزان در نمودار شماره ۶ نشان می‌دهد که در همه دوزها، آمیگدالین پوشش نشده تاثیر بیش‌تر و بهتری بر حافظه اجتنابی دارد به عبارت دیگر پوشش کردن آمیگدالین با نانوذرات کیتوزان باعث بهبود عملکرد آن نشده است. مطالعات نشان داده‌اند که نانوذرات کیتوزان و مشتقات آن به عنوان ترکیبات زیست تخریب‌پذیر، فعالیت‌های زیستی خود را بر روی

حداقل در دوزهای مورد استفاده در این مطالعه نه تنها تأثیر مخربی بر حافظه ندارد بلکه می‌تواند حافظه اجتنابی تخریب شده را بازیابی کند. به علاوه این که استفاده از نانوذرات کیتوزان باعث بهبود عملکرد آمیگدالین در ارتباط با حافظه اجتنابی تخریب شده نگردد. لذا توصیه می‌شود که تأثیر آمیگدالین خوراکی با دوزهای مختلف نیز بر انواع حافظه مورد بررسی قرار گیرد.

سپاسگزاری

این مطالعه مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد آقایان گل محمد کلتی و یعقوب احمدی دانشجویان دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان بوده است و بدین وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان و هم‌چنین از آقای دکتر مهدی عبادی از گروه شیمی دانشگاه آزاد اسلامی گرگان جهت تهیه آمیگدالین و نانوذرات کیتوزان تشکر و قدردانی می‌گردد.

سلول‌های عصبی و سد خونی مغزی در سطح مولکولی اعمال می‌کنند و می‌توانند در درمان آلزایمر مفید باشند (۲۲، ۱۷). از آنجایی که تحویل داروها به بافت مغز در درمان بیماری‌های سیستم عصبی مرکزی به دلیل سد خونی مغزی بسیار چالش برانگیز است؛ لذا با استفاده از کیتوزان و مشتقات آن به عنوان روش‌های دارو رسانی، می‌توان داروها را به صورت پایدار و منظم تجویز کرد، پایداری آن‌ها را افزایش و احتمال عوارض جانبی دارویی را کاهش داد (۴۴). بر خلاف بسیاری از پلیمرها، کیتوزان هم‌چنین ویژگی کاتیونی و چسبنده را نشان می‌دهد که به‌ویژه برای افزایش جذب سلولی توسط فعل و انفعالات یونی و هم‌چنین برای افزایش نفوذ داروها از طریق غشاهای مخاطی مناسب است (۴۵).

وجود اختلاف نظرهای کلی که در مورد عملکرد آمیگدالین بر سیستم‌های بدن وجود دارد، نتایج این مطالعه که برای اولین بار در خصوص تأثیر آمیگدالین بر فراموشی انجام شده است نشان داد که آمیگدالین

References

1. Stern SA, Alberini CM. Mechanisms of memory enhancement. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2013; 5(1): 37-53.
2. Eysenck M, Eysenck MW. *Simply Psychology*. 2nd Ed. London: Psychology Press; 2012.
3. Knopman DS, Amieva H, Petersen RC, Chételat G, Holtzman DM, Hyman BT, et al. Alzheimer disease. *Nat Rev Dis Prim* 2021; 7(1): 33.
4. Burns A, Iliffe S. Alzheimer's disease. *BMJ* 2009; 338: b158.
5. Tackenberg C, Kulic L, Nitsch RM. Familial Alzheimer's disease mutations at position 22 of the amyloid β -peptide sequence differentially affect synaptic loss, tau phosphorylation and neuronal cell death in an ex vivo system. *PLoS One* 2020; 15(9): e0239584.
6. Del Ciampo LA, Del Ciampo IRL. Binge drinking and the risks to adolescent health. *J Drug Deliv Ther* 2024; 14(4): 170-172.
7. World Health Organization. Reporting about alcohol: a guide for journalists. World Health Organization 2023. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240071490>.
8. Eashwar VMA, Umadevi R, Gopalakrishnan S. Alcohol consumption in India—An epidemiological review. *J Family Med Prim Care* 2020; 9(1): 49-55.
9. Bakhtazad A, Taei AA, Parvizi F, Kadivar M, Farahmandfar M. Repeated pre-exposure to morphine inhibited the amnesic effect of ethanol on spatial memory: Involvement of CaMKII and BDNF. *Alcohol* 2024; 114: 9-24.

10. Bagheri F, Goudarzi I, Lashkarbolouki T, Elahdadi Salmani M, Goudarzi A, Morley-Fletcher S. Improving behavioral deficits induced by perinatal ethanol and stress exposure in adolescent male rat progeny via maternal melatonin treatment. *Psychopharmacology (Berl)* 2024; 241(1): 153-169.
11. Wang J, Akbari A, Chardahcherik M, Wu J. Ginger(Zingiber Officinale Roscoe) ameliorates ethanol-induced cognitive impairment by modulating NMDA and GABA-A receptors in rat hippocampus. *Metab Brain Dis* 2024; 39(1): 67-76.
12. Zavvari F, Karimzadeh F. A Review on the Behavioral Tests for Learning and Memory Assessments in Rat. *Shefaye Khatam* 2017; 5(4): 110-124.
13. Palombo P, Maeda R, Zaniboni CR, Engi SA, Yokoyama T, Bertagna NB, et al. Unlocking the role of dorsal hippocampal $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors in Ethanol-Induced conditioned place preference in mice. *Neurosci Lett* 2024; 824: 137666.
14. Reitz NL. The Emergence of Unique Spatial and Hippocampal Dysfunction Following Adolescent Intermittent Ethanol Exposure and Aging [dissertation]. New York: State University of New York at Binghamton, 2020.
15. Kipp BT, Nunes PT, Galaj E, Hitchcock B, Nasra T, Poynor KR, et al. Adolescent ethanol exposure alters cholinergic function and apical dendritic branching within the orbital frontal cortex. *Neuroscience* 2021; 473: 52-65.
16. Karimi M, Pakpur B, Dastpak A, Ahmadi R. The effect of ethanolic Narcissus tazetta L. bulb extract in ethanol-induced amnesia in rat. *Plant cell molecuol biolog* 2013. (Persian).
17. Iri G, Azami N, Heidari M, Eabdi M. Effect of chitosan nanoparticle enclosed curcumin on ethanol induced amnesia in NMRI mice. *RJMS* 2020; 27: 26-36.
18. Liczbiński P, Bukowska B. Molecular mechanism of amygdalin action in vitro: review of the latest research. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2018; 40(3): 212-218.
19. He XY, Wu LJ, Wang WX, Xie PJ, Chen YH, Wang F. Amygdalin-A pharmacological and toxicological review. *J Ethnopharmacol* 2020; 254: 112717.
20. Chen YU, Ma J, Wang F, Hu J, Cui A, Wei C, et al. Amygdalin induces apoptosis in human cervical cancer cell line HeLa cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2013; 35(1): 43-51.
21. Nguyen-Thi PT, Ho TT, Nguyen TT, Van Vo G. Nanotechnology-based Drug Delivery for Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Curr Drug Deliv* 2024; 1(7): 917-931.
22. Heidari M, Azami NS, Ebadi M. Effects of Nano-Chitosan Loaded with Donepezil on Ethanol Induced Amnesia in Swiss-type Mice. *Iran South Med J* 2020; 23(5): 431-441 (Persian).
23. Azami N, Heidari M, Jahanshahi M. The Evaluation of Amnesia Induced by Scopolamine on the Astrocytes Number in Rats Dentate Gyrus. *J Babol Univ Med Sci* 2012; 14(1): 36-44 (Persian).
24. Hajizadeh E, Khezri S, Piri M. Influence Of Ethanol On Amnesia And State-Dependent Learning Induced By Scopolamine In Male Mouse. *Anim Biolog* 2013; 6(4): 1-11.
25. Azami NS, Piri M, Oryan S, Jahanshahi M, Babapour V, Zarrindast MR. Involvement of dorsal hippocampal α -adrenergic receptors in

- the effect of scopolamine on memory retrieval in inhibitory avoidance task. *Neurobiol Learn Mem* 2010; 93(4): 455-462.
26. Seifhosseini S, Jahanshahi M, Moghimi A, Aazami NS. The effect of scopolamine on avoidance memory and hippocampal neurons in male Wistar rats. *Basic Clin Neurosci* 2011; 3(1): 9–15.
 27. Piri M, Moshfegh A, Raoufi N, Shahin MS. The Influence of L-arginine in the Improving Effect of Nicotine on Ethanol-induced Amnesia. *J Anim Biol* 2012; 4(2).
 28. Raoufi N, Piri M, Moshfegh A, Shahin MS. Nicotine improves ethanol-induced impairment of memory: possible involvement of nitric oxide in the dorsal hippocampus of mice. *Neuroscience* 2012; 219: 82-91.
 29. Pakpour B, Hadidi Ah, Navaeian M, Jafari P, Ghobadnia B, Mohammadi B. Repair Ethanol Induced Amnesia With Iranian Lactobacillus Brevis In Rats. *J Apld Microbiolo Food Indust* 2015; 1(1): 1-11.
 30. Ahmadi-Soleimani SM, Ghasemi S, Rahmani MA, Gharaei M, Mohammadi Bezanaj M, Beheshti F. Oral administration of coenzyme Q10 ameliorates memory impairment induced by nicotine-ethanol abstinence through restoration of biochemical changes in male rat hippocampal tissues. *Sci Rep* 2024; 14(1): 11413.
 31. haudhary S, Sarkar DK. Fetal alcohol exposure impairs learning and memory functions and elevates levels of various biochemical markers of Alzheimer's disease in the brain of 12- month- old rats. *Alcohol Clin Exp Res (Hoboken)* 2023; 47(5): 882-892.
 32. Fodale V, Mafrica F, Caminiti V, Grasso G. The cholinergic system in Down's syndrome. *J Intellect Disabil* 2006; 10(3): 261-274.
 33. Mesulam M. The cholinergic lesion of Alzheimer's disease: pivotal factor or side show? *Learn Mem* 2004; 11(1): 43-49.
 34. Marucci G, Buccioni M, Dal Ben D, Lambertucci C, Volpini R, Amenta F. Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 2021; 190: 108352.
 35. Iwasa K, Yagishita S, Yagishita-Kyo N, Yamagishi A, Yamamoto S, Yamashina K, et al. Long term administration of loquat leaves and their major component, ursolic acid, attenuated endogenous amyloid- β burden and memory impairment. *Sci Rep* 2023; 13(1): 16770.
 36. Lee SS, Kim CJ, Shin MS, Lim BV. Treadmill exercise ameliorates memory impairment through ERK-Akt-CREB-BDNF signaling pathway in cerebral ischemia gerbils. *J Exerc Rehabil* 2020; 16(1): 49-57.
 37. Cheng Y, Yang C, Zhao J, Tse HF, Rong J. Proteomic identification of calcium-binding chaperone calreticulin as a potential mediator for the neuroprotective and neurotogenic activities of fruit-derived glycoside amygdalin. *J Nutr Biochem* 2015; 26(2): 146-154.
 38. Kolesar E, Tvrda E, Halenar M, Schneidgenova M, Chrastinova L, Ondruska L, et al. Assessment of rabbit spermatozoa characteristics after amygdalin and apricot seeds exposure in vivo. *Toxicol Rep* 2018; 5: 679-686.
 39. Lee SK, Rhee JS, Yum HS. Cyanide poisoning deaths detected at the national forensic service headquarters in seoul of korea: A six year survey (2005~2010). *Toxicol Res* 2012; 28(3): 195-199.
 40. Rajaei F, Moghaddam-shad M, Salehi Z. The effects of amygdalin on the morphologic

- structure of mouse cerebellar cortex. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2013; 15(3): 26-32 (Persian).
41. Halenš M, Medveš M, Maruniaková N, Kolesář A. Amygdalin and its effects on animal cells. *J Microbiol Biotechnol food Sci* 2013; 2(2): 2217-2226.
 42. Van der JG. Estimation of the LD50 (Oral, Rat) Bitter Almonds by Kinetic Computer Models' 4.3. *J Toxic* 2005; Available from: <http://members.tele2.nl/galien8/amygdalin/amygdalin.html>.
 43. Jafari-Sabet M, Mofidi H, Attarian-Khosroshahi MS. NMDA receptors in the dorsal hippocampal area are involved in tramadol state-dependent memory of passive avoidance learning in mice. *Can J Physiol Pharmacol* 2018; 96(1): 45-50.
 44. Iyer M, Elangovan A, Sennimalai R, Babu HWS, Thiruvengataswamy S, Krishnan J, et al. Chitosan—An alternative drug delivery approach for neurodegenerative diseases. *Carbohydr Polym Technol Appl* 2024; 7: 100460.
 45. Manek E, Darvas F, Petroianu GA. Use of biodegradable, chitosan-based nanoparticles in the treatment of Alzheimer's disease. *Molecules* 2020; 25(20): 4866.